

**Efecto de dos protocolos de criopreservación sobre la fertilidad  
potencial de semen equino**

**JUAN ESTEBAN DUQUE CORTÉS  
JUAN DAVID MONTOYA PÁEZ**

**Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid  
Institución Universitaria  
Facultad de Ciencias Agrarias  
Medellín  
2012**

**Efecto de dos protocolos de criopreservación sobre la fertilidad  
potencial de semen equino**

**JUAN ESTEBAN DUQUE CORTÉS**

C.C 1128.424.225

**JUAN DAVID MONTOYA PÁEZ**

C.C 1020.417.714

**Trabajo de Grado presentado como requisito parcial para optar al  
título de Ingeniero Agropecuario**

**Asesor**

**GIOVANNI RESTREPO BETANCUR**

**Zootecnista**

**Medico Veterinario**

**Magister en Biotecnología**

**Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid**

**Institución Universitaria**

**Facultad de Ciencias Agrarias**

**Medellín**

**2012**

# **Efecto de dos protocolos de criopreservación sobre la fertilidad potencial de semen equino**

Effect of two protocols of cryopreservation on potential fertility of stallion semen

Giovanni Restrepo Betancur<sup>1</sup>, Juan Esteban Duque Cortés<sup>2</sup>, Juan David Montoya Páez<sup>3</sup>

## **Resumen**

La criopreservación de semen es un proceso fundamental para el desarrollo de biotecnologías para la reproducción asistida en equinos. El uso de diferentes técnicas de criopreservación con variación en las concentraciones y la naturaleza de los crioprotectores, así como de diferentes tipos de soportes para el almacenamiento del semen, se ha constituido en alternativas para mejorar los protocolos empleados. El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de dos protocolos de criopreservación (congelación y vitrificación), sobre la fertilidad potencial del semen equino. El estudio se realizó con tres equinos de la raza Criollo Colombiano. Para la congelación se empleó un diluyente suplementado con 4% de yema de

---

<sup>1</sup> Docente, Politécnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, [grestrepo@elpoli.edu.co](mailto:grestrepo@elpoli.edu.co).

<sup>2</sup> Investigador, Grupo de investigación en Biotecnología Animal, Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, [duque8778@hotmail.com](mailto:duque8778@hotmail.com).

<sup>3</sup> Investigador, Grupo de investigación en Biotecnología Animal, Politecnico Colombiano Jaime Isaza Cadavid, Medellín, [juanchon29@hotmail.com](mailto:juanchon29@hotmail.com).

huevo y 5% de dimetilformamida y pajillas de 0.5ml como soportes; mientras para la vitrificación, el diluyente fue suplementado con 8% de yema de huevo y 8% de dimetilformamida y crioviales como soportes. Post-descongelación se evaluaron los parámetros: movilidad progresiva, vitalidad, morfología e integridad de la membrana plasmática (HOST). Para la evaluación estadística se ajustó un modelo lineal generalizado (GLM) y las medias se compararon por la prueba de Tukey. Se encontraron porcentajes promedio de movilidad progresiva, vitalidad, morfología normal y HOST de  $41.6 \pm 11.8$  y  $37 \pm 8.5$ ,  $54.3 \pm 10.2$  y  $52.3 \pm 7.8$ ,  $83.1 \pm 5.4$  y  $83.6 \pm 5.8$ ,  $41.7 \pm 9.8$  y  $38.9 \pm 3.6$ , para el semen criopreservado por congelación y vitrificación, respectivamente. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos para ninguno de los parámetros evaluados. La fertilidad potencial del semen equino criopreservado por vitrificación en crioviales es equiparable a la obtenida por congelación convencional en pajillas.

**Palabras clave:** Inseminación artificial, fertilidad, congelación, vitrificación

## **Abstract**

Semen cryopreservation is a fundamental process for the development of biotechnologies for assisted reproduction in horses. The use of cryopreservation techniques with variations in concentrations and the nature

of the cryoprotectant, as well as different types of media for storage of semen, have become alternatives to improve the protocols used. The objective of this research was to evaluate the effect of two protocols of cryopreservation (freezing and vitrification) on the potential fertility of stallion semen. The study was conducted with three horses of the Criollo Colombiano breed. For freezing was used a diluent supplemented with 4% egg yolk and 5% dimethylformamide and 0.5 ml straws as carriers, whereas for vitrification, the diluent was supplemented with 8% of egg yolk and 8% dimethylformamide , and as supports cryovials. As post thaw parameters were evaluated: progressive motility, vitality, morphology and integrity of the plasma membrane (HOST). For statistical evaluation was fitted a generalized linear model (GLM) and means were compared by the Tukey test. We found average percentages of progressive motility, vitality, normal morphology and HOST of  $41.6 \pm 11.8$  and  $37 \pm 8.5$ ,  $54.3 \pm 10.2$  and  $52.3 \pm 7.8$ ,  $83.1 \pm 5.4$  and  $83.6 \pm 5.8$ ,  $41.7 \pm 9.8$  and  $38.9 \pm 3.6$ , for cryopreserved semen by freezing and vitrification, respectively. There were no statistically significant differences ( $P \leq 0.05$ ) between treatments for any of the parameters evaluated. The fertility potential of equine semen cryopreserved by vitrification in cryovials is comparable to that obtained by conventional freezing in straws.

**Key words:** Artificial insemination, fertility, freezing, vitrification

## **Introducción**

Existen varias metodologías para la criopreservación del semen, las cuales varían principalmente en las velocidades de descenso de temperatura, en las concentraciones de los crioprotectores utilizados, y en los soportes de almacenamiento empleados. Varios crioprotectores han sido evaluados en el proceso de criopreservación, como son el glicerol, el dimetilsulfóxido, el etilenglicol y la dimetilformamida, entre otros (Chenier *et al.*, 1998; Mantovani *et al.*, 2002; Medeiros *et al.*, 2002).

La metodología más utilizada para la conservación de semen equino, es posiblemente la refrigeración a 4°C. Esta técnica produce una reducción en la tasa metabólica de los espermatozoides, permitiendo extender su supervivencia. Sin embargo, el semen solo puede ser almacenado durante pocas horas, dada la rápida reducción de su fertilidad (Ponglowhapan *et al.*, 2004), la cual depende fundamentalmente de la resistencia de la membrana plasmática, al daño causado por los cambios de temperatura y el choque térmico (Sánchez *et al.*, 2006).

La congelación de semen y su almacenamiento en nitrógeno líquido, permiten su conservación por largos periodos de tiempo, alcanzando tasas de fertilidad posteriores al proceso, del 60% al 70% en las especies bovina y canina (Álamo *et al.*, 2005). Para el caso del semen equino, es aún limitado el uso amplio y efectivo de semen congelado, principalmente por su

asociación con la baja fertilidad, y por la inconsistencia en los resultados obtenidos. Como es conocido, el semen equino es extremadamente sensible a las alteraciones celulares generadas por la congelación, al estrés osmótico resultado de la exposición a medios hipertónicos, y adicionalmente a los cambios osmóticos inducidos durante el proceso (Ball, 2008). El estrés osmótico ha sido relacionado con efectos adversos sobre la movilidad, la viabilidad y el potencial de membrana mitocondrial en espermatozoides equinos, lo cual podría estar asociado con el estrés oxidativo (Ball y Vo, 2001; Pommer *et al.*, 2002), debido a que el estrés osmótico tanto en condiciones hipotónicas como hipertónicas, puede incrementar la producción de anión superóxido en el semen equino (Burnaugh *et al.*, 2007). Investigadores asociaron la criopreservación con la presentación de cambios celulares relacionados con la apoptosis en los espermatozoides equinos; al evidenciar en estos, cambios significativos en el porcentaje de caspasas activas, en la actividad mitocondrial, en la permeabilidad de la membrana plasmática, en la movilidad total y en la movilidad progresiva (Brum *et al.*, 2008). Diferentes marcadores de apoptosis pueden ser usados para predecir la resistencia a la congelación de los espermatozoides de los ejemplares equinos (Ortega-Ferrulosa *et al.*, 2009).

En la criopreservación del semen equino, otro aspecto importante son los daños que ocurren en las mitocondrias del espermatozoide, con lo cual frecuentemente al evaluar su morfología después de la congelación y la

descongelación, se encuentra un moderado hinchamiento de la pieza media, representando una distensión de las mitocondrias, sugiriendo que estas organelas son un sitio con un criodañó significativo (Ball, 2008). También se han reportado cambios similares a los que ocurren en la capacitación en los espermatozoides criopreservados, en un proceso denominado "criocapacitación" (Thomas, 2006).

Los protocolos de congelación rápida y ultrarrápida previenen la formación de hielo intracelular mediante la deshidratación de la célula, por su exposición a altas concentraciones de crioprotectores permeables (4 a 6 mol/L) y azúcares. La congelación rápida involucra un enfriamiento rápido por la exposición de las células a vapores de nitrógeno líquido, mientras la congelación ultrarrápida requiere sumergirlas directamente en nitrógeno líquido, para un enfriamiento ultrarrápido (Albarracín, 2005). La vitrificación corresponde a una técnica de criopreservación ultrarrápida, que desencadena la formación de un estado vítreo similar al cristal, sin presencia alguna de cristales de hielo intracelular y extracelular, disminuyendo así el daño de las células (Bailey *et al.*, 2000; Orief *et al.*, 2005). Las ventajas de la vitrificación son grandes respecto a los métodos tradicionales de congelación, por sus menores costos en equipos, su sencillez y la disminución del tiempo de exposición a bajas temperaturas. Sin embargo, presenta como dificultades, los efectos nocivos del choque osmótico por el uso de soluciones hipertónicas, los efectos tóxicos causados por la naturaleza química y las



altas concentraciones de crioprotectores y las alteraciones celulares relacionadas con la exposición a bajas temperaturas (Lopera *et al.*, 2007). Nuevas técnicas de vitrificación de espermatozoides sin crioprotectores, realizadas mediante la exposición directa de estas células al nitrógeno líquido en soportes especiales, han logrado preservar su habilidad para la fertilización, con tasas de movilidad 2,87 veces mayores que en procesos de vitrificación convencional (Isachenko *et al.*, 2004; Saki *et al.*, 2009). El objetivo de esta investigación fue evaluar el efecto de dos protocolos de criopreservación (congelación y vitrificación), sobre la fertilidad potencial del semen equino.

## **Materiales y Métodos**

### **Recolección de material de investigación**

El estudio se realizó con tres ejemplares equinos de la raza criollo colombiano, ubicados en el municipio de Girardota (Antioquia), los cuales se sometieron a condiciones estándar de alimentación, condición corporal, ambiente, manejo general y reproductivo. El procedimiento de la recolección del semen fue mediante el método de la vagina artificial, con una vagina modelo Missouri lubricada con gel no espermicida. La fracción en gel del eyaculado fue removida por filtración. Se utilizó una yegua como maniquí, favoreciendo la estimulación del semental. Se recolectaron entre 3 y 5 eyaculados por animal, con un periodo de descanso máximo de 7 días. El

semen recién recolectado fue mantenido a 37°C y fue diluido en proporción 1:1 en un diluyente a base de leche descremada, azúcares y antibióticos (EquiPro®, Minitube), precalentado a 37°C. Posteriormente el semen fue transportado en refrigeración a 4°C a un laboratorio de Biotecnología Animal, dentro de las ocho horas posteriores a su recolección.

### **Evaluación de la calidad seminal**

A cada eyaculado recolectado se le realizaron evaluaciones convencionales de fertilidad a través de microscopía de contraste de fase. Se determinó la movilidad espermática promediando los porcentajes de movilidad progresiva de cinco diferentes campos de observación (400X). La concentración espermática del semen fresco se determinó por espectrofotometría (Spermacue®, Minitube).

La evaluación de la morfología y la vitalidad espermática se realizó a partir de un extendido seminal coloreado con la técnica de eosina-nigrosina modificada por Barth y Oko (1989), para la cual sobre un portaobjetos temperado a 37°C una gota de semen fue mezclada durante 30 segundos con una gota de colorante eosina-nigrosina temperado a 37°C; se realizó el extendido y la fijación del mismo con calor sobre una platina térmica. Se observó al microscopio con objetivo de 100X la morfología individual de 100 espermatozoides, los cuales fueron clasificados como anormales aquellos

espermatozoides con anomalías primarias o secundarias. Los espermatozoides teñidos con la tinción supravital fueron clasificados como muertos, mientras aquellos que no incorporaron el colorante fueron clasificados como vivos. Finalmente se establecieron porcentajes generales de espermatozoides morfológicamente normales y espermatozoides vivos.

Para la evaluación de la integridad de las membranas celulares de los espermatozoides congelados se utilizó el método de la prueba hipoosmótica (HOST), en el cual 100µl de semen descongelado se adicionaron a un tubo con 500µl de la solución hipoosmótica (100mOsmol/L) compuesta por sacarosa 5.4% y citrato de sodio 2.94% en agua grado reactivo. Esta mezcla fue incubada a 38.5°C por 30 minutos y luego se evaluó el hinchamiento espermático de 100 células en mínimo 5 campos diferentes. Finalmente se determinó la proporción total de espermatozoides reaccionados.

Como criterios de selección, solo se procesaron los eyaculados con un mínimo de 60% de movilidad progresiva, una concentración mínima de 100 millones de espermatozoides por ml y un mínimo de 70% de espermatozoides morfológicamente normales.

## **Criopreservación de semen equino**

La criopreservación del semen se realizó mediante dos protocolos: 1. Congelación rápida en vapores de nitrógeno, y 2. Vitrificación de semen en crioviales. Igualmente se realizó un control con semen no criopreservado.

Para la congelación rápida del semen, el eyaculado fue centrifugado a 1500rpm por 15 minutos, luego el pelet fue resuspendido en 2ml de diluyente de congelación compuesto por diluyente base EquiPro® suplementado con 5% de dimetilformamida (DMF) y 4% de yema de huevo; luego fue resuspendido en este mismo medio en cantidad suficiente para una concentración final de 100 millones de espermatozoides/ml. El semen diluido se mantuvo en refrigeración a 4°C por 30 minutos y se empacó en pajillas de 0.5ml. Las pajillas luego fueron nuevamente refrigeradas a 4°C por 10 minutos y posteriormente se sometieron a criopreservación rápida en vapores de nitrógeno líquido, al ser puestas horizontalmente a una distancia de 4 cm de la superficie de este durante 10 minutos. Finalmente las pajillas se sumergieron en un tanque de almacenamiento de nitrógeno líquido a -196°C. Después de 1 semana, se realizó la descongelación de pajillas a 37°C por un minuto en un baño María.

La vitrificación de semen se realizó según el procedimiento reportado por (Peirouvi *et al*, 2007), modificado para su aplicación en semen equino. Para lo cual 500µl de semen fueron pipeteados en crioviales de 1.8ml, y

mezclados con medio de preservación de semen EquiPro® suplementado con 8% de yema de huevo y 8% de DMF, en volumen suficiente para una concentración espermática ajustada a  $100 \times 10^6$  espermatozoides por ml. La mezcla en los crioviales se expuso a 4 cm de vapores de nitrógeno por 10 minutos y luego se almacenó en el termo de nitrógeno. Una semana después, cada criovial fue removido del termo, y luego transferido a un baño de agua a 37°C por 5 minutos; posteriormente se realizaron las evaluaciones correspondientes.

### **Diseño estadístico**

Para la evaluación estadística se realizó un diseño completamente al azar, y los datos fueron analizados mediante un modelo lineal generalizado (GLM) para cada una de las variables dependientes (movilidad progresiva, vitalidad, morfología normal y HOST). Las medias para cada tratamiento se compararon por la prueba de Tukey. El modelo empleado fue:  $Y_{ijkl} = \mu + E_i + T_j + R_k + Cov_l + e_{ijklm}$ , donde:

$Y_{ijkl}$ : Movilidad progresiva / Vitalidad / Morfología / HOST

$\mu$ : Media común a todos los tratamientos.

$E_i$ : Efecto fijo del equino ( $i$ ). ( $i=1 \dots 3$ ).

$T_{oj}$ : Efecto fijo del tratamiento ( $j$ ). ( $j$ =fresco, congelación, vitrificación).

$R_k$ : Efecto fijo de la repetición ( $k$ ). ( $k=1... 12$ ).

$Cov_l$ : Efecto fijo de la(s) covariable (s) ( $l$ ). ( $l=0... 100$ ).

$e_{ijklm}$ : Error aleatorio.

Según la variable dependiente para cada modelo ajustado, se incluyeron como covariables los resultados de movilidad progresiva, vitalidad, morfología normal o HOST.

Para determinar la asociación entre las variables se realizó un análisis de correlación de Pearson de acuerdo a la expresión:  $r(X,Y) = cov(X,Y)/\sigma_x\sigma_y$ .

Todos los análisis fueron desarrollados mediante el programa SAS 9.2.

## **Resultados**

Para la variable movilidad progresiva se encontró un promedio de 43.7% con un coeficiente de variación de 18.6. El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del modelo ajustado para esta variable fue de 0.84, y fueron significativos los efectos de equino, HOST y vitalidad. Para la variable de vitalidad se encontró un promedio de 56.5% con un coeficiente de variación de 12.6. El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del modelo ajustado para la variable fue de 0.80, siendo significativos los efectos de equino, tratamiento y movilidad. En el

caso de la morfología normal se encontró un promedio de 82.9% con un coeficiente de variación de 31.57. El coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del modelo ajustado en esta variable fue de 0.29, siendo significativo solo el efecto del equino; y para la variable de HOST se encontró un promedio de 44.7% con un coeficiente de variación de 15; el coeficiente de determinación ( $r^2$ ) del modelo ajustado en esta variable fue de 0.84, y fueron significativos los efectos de equino, tratamiento y movilidad.

Los resultados de los diferentes tratamientos para las variables movilidad progresiva, vitalidad, morfología y HOST, se describen en la tabla 1.

**Tabla 1.** Resultados para los parámetros de fertilidad potencial por tratamiento ( $\bar{x} \pm DE$ ).

TRATAMIENTO	n	MOVILIDAD	VITALIDAD	MORFOLOGIA	HOST
FRESCO	16	78,7±6,2 <sup>a</sup>	80±7,5 <sup>a</sup>	85,9±5,7 <sup>a</sup>	74,4±10,3 <sup>a</sup>
CONGELACION	32	41,6±11,9 <sup>b</sup>	54.3 ±10,3 <sup>b</sup>	83.1 ±5,4 <sup>a</sup>	41.7 ±9,7 <sup>b</sup>
VITRIFICACION	35	37 ± 8.5 <sup>b</sup>	52.2 ±7.9 <sup>b</sup>	83.6 ±5.8 <sup>a</sup>	38.8 ±3.6 <sup>b</sup>

Promedios con letras diferentes denotan diferencia estadística significativa ( $P \leq 0.05$ ) entre los tratamientos.

Los coeficientes de correlación denotaron una asociación alta y positiva entre las variables movilidad progresiva, vitalidad e integridad de membrana (HOST), mientras entre la movilidad progresiva y la morfología normal, así como entre la vitalidad y la morfología normal se encontraron bajos niveles

de asociación. No se encontró una asociación significativa entre la morfología normal y la integridad de membrana (HOST). Los coeficientes de correlación entre las variables se presentan en la tabla 2.

**Tabla 2.** Coeficientes de correlación entre los parámetros de fertilidad potencial del semen equino.

<i>Coeficientes de correlación Pearson</i>				
	<b>MOVILIDAD</b>	<b>VITALIDAD</b>	<b>MORFOLOGIA</b>	<b>HOST</b>
<b>MOVILIDAD</b>		<b>0.78</b>	<b>0.24</b>	<b>0.79</b>
		<i>&lt;.0001</i>	<i>0.03</i>	<i>&lt;.0001</i>
		83	83	74
<b>VITALIDAD</b>	<b>0.78</b>		<b>0.23</b>	<b>0.74</b>
	<i>&lt;.0001</i>		<i>0.04</i>	<i>&lt;.0001</i>
	83		83	71
<b>MORFOLOGIA</b>	<b>0.24</b>	<b>0.23</b>		<b>-0.06</b>
	<i>0.03</i>	<i>0.04</i>		<i>0.62</i>
	83	83		71
<b>HOST</b>	<b>0.79</b>	<b>0.74</b>	<b>-0.06</b>	
	<i>&lt;.0001</i>	<i>&lt;.0001</i>	<i>0.62</i>	
	74	71	71	

Se reportan los valores de correlación, valor de P, y el número de repeticiones. Se consideran significativas las correlaciones con valores de  $P \leq 0.05$ .



## Discusión

De acuerdo a los resultados se observó un efecto perjudicial de la criopreservación, tanto por congelación como por vitrificación, sobre los parámetros movilidad progresiva, vitalidad e integridad de membrana del semen equino, respecto al semen fresco. Este mismo efecto ha sido descrito por Salazar *et al.* (2011) quien evidenció este mismo resultado de la criopreservación sobre el semen equino. No se presentó efecto de la criopreservación sobre la morfología normal del semen equino, dado que no hubo diferencia estadística significativa entre los valores de semen fresco y el semen criopreservado por ambos procedimientos.

Para la evaluación del semen equino fresco se reportan resultados de movilidad progresiva de  $41.5\% \pm 5.4\%$  (Kankofer *et al.*, 2005),  $68.3\% \pm 3.7\%$  (Pérez-Osorio *et al.*, 2008),  $73\% \pm 6.3\%$  (Cocchia *et al.*, 2011); vitalidad de  $81\% \pm 5.2\%$  (Cocchia *et al.*, 2011),  $55.1\% \pm 14.4\%$  (Henry *et al.*, 2002),  $86.6\% \pm 4.3\%$  (Sieme *et al.*, 2003), morfología normal de  $43.4\% \pm 19.9\%$  (Neild *et al.* 2000) e integridad de membrana de  $56.1\% \pm 14.2\%$  (Neild *et al.*, 2000),  $56.2\% \pm 8.6\%$  (Pérez-Osorio *et al.*, 2008). Mientras para semen equino criopreservado se reportan valores de movilidad progresiva de  $56.1 \pm 20.93$  (Hoffmann *et al.*, 2011),  $23\%$  (Squires *et al.*, 2004),  $55.3\% \pm 14.3\%$  (Henry *et al.*, 2002), vitalidad de  $32.6\% \pm 6.52$  (Hoffmann *et al.*, 2011),  $44.1\%$  (Madeiros *et al.*, 2002),  $12\% \pm 9.9\%$  (Henry *et al.*, 2002) e integridad de membrana de  $52.8\%$  (Mantovani *et al.*,

2002). Siendo valores en algunos casos inferiores, y otros equiparables a los obtenidos en esta investigación.

Entre los tratamientos para la criopreservación de semen equino (congelación vs. vitrificación), no se encontró diferencia estadística significativa para los parámetros de fertilidad potencial, movilidad progresiva, vitalidad, morfología normal e integridad de membrana (HOST), con lo cual puede considerarse que la criopreservación por vitrificación es equiparable a la criopreservación por congelación rápida respecto a la fertilidad potencial del semen equino posterior a la criopreservación.

La vitrificación de semen es principalmente reportada en humanos, donde ha mostrado gran eficiencia en el mantenimiento de la integridad y la fertilidad de los espermatozoides (Isachenko *et al.*, 2004a, 2004b; Peirouvi *et al.*, 2007). Respecto al soporte para el empaque del semen, Oliveira *et al.* (2006) en un estudio con semen de burros de la raza Brasileira Pêga, no encontraron diferencias estadísticas entre el uso de la pajuela francesa de 0.5 ml y el macrotubo de 2.5ml.

Kozink *et al.* (2006) al comparar diferentes dispositivos de almacenamiento de semen, describen resultados de 39.3% para la movilidad del semen equino empacado en pajillas de 0.5 ml, y de 31.7% para la movilidad del semen empacado en crioviales de 3.6 ml. Mientras Gomez *et al.* (2011) para

semen empacado en crioviales de 2.0 ml, encontró un valor de movilidad del 41.9%. Estos resultados no difieren de los hallados en esta investigación, dado que los promedios de movilidad cuando el semen fue empacado en pajillas o en crioviales, no fueron diferentes estadísticamente.

De acuerdo a lo anterior, la vitrificación puede considerarse como una alternativa viable para la criopreservación de semen equino, destinado a la inseminación artificial, toda vez que además de conservar estándares de fertilidad potencial en el mismo, equiparables a la criopreservación convencional en pajillas, permite el almacenamiento de dosis mayores de semen en los crioviales, con lo que se podría requerir descongelar solo uno para realizar la inseminación (Gomez *et al.*, 2011). Según Samper y Morris (1998), de forma convencional una sola inseminación requiere de múltiples pajillas, con lo cual aumenta el riesgo de fallo, por el hecho de descongelarlas para juntarlas en una sola dosis, lo cual puede ser superado con el uso de crioviales. Adicionalmente, Clulow *et al.* (2008) reportan que los diferentes parámetros de fertilidad potencial no se ven afectados al cambiar las dosis de semen empacadas.

La alta asociación encontrada entre los parámetros de movilidad progresiva, vitalidad e integridad de membrana, demuestran su importancia en la fertilidad potencial del semen equino, siendo indicadores de integridad funcional y estructural de los espermatozoides. La baja asociación entre la morfología normal de los espermatozoides y los demás parámetros de

fertilidad indica que este parámetro se comporta de forma independiente en el análisis de la calidad seminal, siendo de resaltar su baja repercusión en la movilidad del semen equino.

## **Conclusiones**

Se concluye que la fertilidad potencial del semen equino criopreservado por vitrificación en crioviales es equiparable a la obtenida por congelación convencional en pajillas, por lo que puede considerarse la utilización de crioviales como alternativa para la criopreservación de semen equino empleado para la inseminación artificial.

## **Bibliografía**

Álamo, D., Batista, M., González, F., Rodríguez, N., Cruz, G., Cabrera, F. and Gracia, A. 2005. Cryopreservation of semen in the dog: use of ultra-freezers of  $-152^{\circ}\text{C}$  as a viable alternative to liquid nitrogen. *Theriogenology* 63(1), 72-82.

Albarracín, M. 2005. Vitrificación de ovocitos bovinos mediante la técnica open pulled straw: estudio estructural de cromosomas microtúbulos y microfilamentos y posterior desarrollo embrionario *in Vitro* [tesis de

doctorado]. España: Facultad de veterinaria, Universidad Autónoma de Barcelona.

Bailey, J., Bilodeau, J. and Cormier, N. 2000. Semen cryopreservation in minireview domestic animals: a damaging and capacitating phenomenon. *J. Androl.* 21(1), 1-7.

Ball, B. 2008. Oxidative stress, osmotic stress and apoptosis: Impacts on sperm function and preservation in the horse. *Anim. Reprod. Sci* 107(3-4), 257-267.

Ball, B. and Vo, A. 2001. Osmotic tolerance of equine spermatozoa and the effects of soluble cryoprotectants on equine sperm motility, viability, and mitochondrial membrane potential. *J. Androl* 22 (6), 1061-1069.

Barth, A. D. and Oko. R. J. 1989. Anormal morfology of bovine spermatozoa. 1 ed. Iowa City I.A: Iowa State University press, 20 p.

Burnaugh, I., Sabeur, K. and Ball, B. 2007. Generation of superoxide anion by equine spermatozoa as detected by dihydroethidium. *Theriogenology* 67(3), 580-589.

Chenier, T., Merckies, K., Plante, C. and Johnson, W. 1998 Evaluation of cryoprotective agents for use in the cryopreservation of equine spermatozoa. *AAEP Proceedings.* 44, 5-6.

Clulow, J.R., Mansfield, L.J., Morris, L.H., Evans, G. and Maxwell, W.M. 2008. A comparison between freezing methods for the cryopreservation of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 108, 298-308.

Cocchia, N, Pasolinia, M, Mancinib, R, Petrazzuoloc, O, Cristofarod I, Rosapane, I. 2011. Effect of sod (superoxide dismutase) protein supplementation in semen extenders on motility, viability, acrosome status and ERK (extracellular signal-regulated kinase) protein phosphorylation of chilled stallion spermatozoa. *Theriogenology* 75 (1), 201–1210.

Gomez Lorenzoni, S.L., Arruda, N.S. and Rodrigues, J.L. 2011. Cryopreservation of equine semen loaded in cryovials. *Acta scientiae veterinariae* 39(2), 962

Henry, M., Snoeck, P. and Cottorello, A. 2002. Post-thaw spermatozoa plasma integrity and motility of stallion semen frozen with different cryoprotectants. *Theriogenology* 58, 245-248.

Hoffmann, N., Oldenhof, H., Morandini, C., Rohn, K. and Sieme, H. 2011. Optimal concentrations of cryoprotective agents for semen from stallions that are classified 'good' or 'poor' for freezing. *Anim. Reprod. Sci.* 125, 112– 118.

Isachenko, V., Isachenko, E., Katlov, I.I., Montag, M., Dessole, S., Nawroth, F. and Van der ven, H. 2004. Cryoprotectant-free cryopreservation of human spermatozoa by vitrification and freezing in vapor: effect on motility, DNA integrity, and fertilization ability. *Biol. Reprod.* 71(4),1167–1173.

Isachenko, V., E Isachenko, I., Katkov, G., Rahimi, E. Schondorf, P., Mallmann, S., Dessole, F. and Nawroth. 2004. DNA integrity and motility of human spermatozoa after standard slow freezing versus cryoprotectant-free vitrification. *Hum. Reprod.* 19(4), 932-939.

Kankofer, M., Kolm, G., Aurich, J. y Aurich, C. 2005. Activity of glutathione peroxidase, superoxide dismutase and catalase and lipid peroxidation intensity in stallion semen during storage at 5°C. *Theriogenology* 63(5),1354–1365.

Kozink, D.M., Rubio, C. and Pinto, C.R. 2006. Cryopreservation of stallion spermatozoa in polypropilene cryovial vials. *Ani. Reprod. Sci.* 94 (1-4), 96-98.

Lopera, V., Méndez, I., Peña, M. y Góngora, A. 2007. Vitricación de oocitos bovinos inmaduros por el método de la pajilla abierta y estirada (Open pulled Straw - OPS). *Rev. Col. Cienc. Pec.* 20,532-540.

Madeiras, A., Gomes, G., Carmo, M., Papa, F. and Alvarenga, M. 2002. Cryopreservation of stallion sperm using different amides. *Theriogenology* 58, 273-276.

Mantovani, R., Rota A., Falomo, M., Bailoni, I. and Vincenti, I. 2002. Comparison between glycerol and ethylene glycol for the cryopreservation of equine spermatozoa: semen quality assessment with standard analyses and

with the hypoosmotic swelling test. *Reprod. Nutr. Dev.* 42(3),217–226.

Oliveira, J.V., Alvarenga, M.A., Melo, C.M., Macedo, L.M, Delláquajr, J.A, Papa, F.O. 2006. Effect of cryoprotectant on donkey semen freezeability and fertility. *Anim. Reprod. Sci.* 94,82-84.

Ortega-Ferrusola, C., Macías, B., Gallardo-Bolaños, J.M., González-Fernandez, I., Rodriguez-Martinez, H., Tapia, J.A. and Peña, F.J .2009. Apoptotic markers can be used to forecast the freezeability of stallion spermatozoa. *Anim. Reprod. Sci.* 114(4), 393–403.

Peirouvi, T., Farjah, G., Rad J. and M Novin. 2007. Vitrification induced apoptosis in spermatozoa from fertile and subfertile men. *Iranian J. Reprod. Med.* 5(3), 117-120.

Pommer, A., Rutllant, J. and Meyers, S. 2002. The role of osmotic resistance on equine spermatozoal function. *Theriogenology.* 58(7), 1373-1384.

Saki, G., Rahim, F. and Zergani, M. 2009. Vitrification of small volume of normal human sperms: use of open pulled straw carrier. *J. Med. Sci.* 9, no (1), 30-35.

Salazar, J.L., Teague, S.R., Love, C.C., Brinsko, S.P., Blanchard, T.L. and Varner, D.D. 2011. Effect of crypreservation protocol on postthaw characteristics of stallion sperm. *Theriogenology* 76, 409-418.



Samper, J.C. and Morris, C.A. 1998. Current methods for stallion semen cryopreservation: a survey. *Theriogenology*. 49(5), 895-903.

Sánchez, R., Cartagena, P. y Berland, O. 2006 Comparación del efecto de dos diluyentes sobre la fertilidad potencial de semen canino refrigerado. *Rev. Inv. Vet. Perú* 17(1), 1-7.

Squires, E.L., Keith, S.L. and Graham, L.K. 2004 Evaluation of alternative cryoprotectants for preserving stallion spermatozoa. *Theriogenology* 62, 1056-1065.

Sieme, H., Martinsson, G., Rauterberg, H., Walter, K., Aurich, C., Petzoldt, R. and Klug, E. 2003. Application of Techniques for Sperm Selection in Fresh and Frozen-Thawed Stallion Semen. *Reprod. Dom. Anim.* 38,134-140.

Thomas, A., Meyers, S. and Ball, B. 2006. Capacitation-like changes in equine spermatozoa following cryopreservation. *Theriogenology* 65(8),1531-1550.

Pérez-Osorio, J., Mello, F., Juliani, G., Lagares, M., Lago, L. and Henry, M. 2008. Effect on post-thaw viability of equine sperm using stepwise addition of dimethyl formamide and varying cooling and freezing procedures. *Anim. Reprod. Sci.* 3/4 (5),103-109.